

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-267297

(43)Date of publication of application : 19.11.1987

(51)Int.Cl.

C07K 15/04
C12N 5/00
C12N 15/00
C12P 21/00
G01N 33/53
G01N 33/577
//(C12P 21/00
C12R 1:91)

(21)Application number : 61-109433

(71)Applicant : TOKYO MET GOV SEISHIN
IGAKU SOGO KENKYUSHO

(22)Date of filing : 15.05.1986

(72)Inventor : ISHII TAKESHI
SHINODA TOMOTAKA

(54) MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE TO SENILE SPOT, CELL STRAIN
PRODUCING SAME AND PRODUCTION OF SAID MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

NEW MATERIAL:A monoclonal antibody reactive to senile spot in cerebral structure having 160,000W180,000mol.wt. as a monomer and 800,000W1,000,000mol. wt. as pentamer by polyacrylamide gel secondary electrophoresis using sodium dodecyl sulfate as a protein modifier, 6.3W8.3 isoelectric point, 0.48W0.62 mobility of monomer and 0.11W0.17 mobility of pentamer.

USE: A diagnosticum for Alzheimer's senile dementia and Alzheimer's disease.

PREPARATION: For example, a splenic cell which is obtained by immunizing a mouse against amyloid protein separated from autopsy spleen of a patient of human protopathic amyloidosis as an antigen and a mouse myeloma cell are subjected to cell fusion, the formed fused cell is cloned by limiting dilution method into a monoclonal and then the monoclonal cell is cultivated to obtain a monoclonal antibody from the supernatant liquid of the culture mixture.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-267297

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和62年(1987)11月19日
C 07 K 15/04		8318-4H	
C 12 N 5/00		7115-4B	
		7115-4B	
C 12 P 21/00		6712-4B	
G 01 N 33/53		D-7906-2G	
		7906-2G	
33/577			
/(C 12 P 21/00			
C 12 R 1:91)			

審査請求 未請求 発明の数 3 (全 13 頁)

⑭ 発明の名称 老人斑反応性モノクローナル抗体、それを産生する細胞株及び該モノクローナル抗体の製造方法

⑯ 特 願 昭61-109433

⑰ 出 願 昭61(1986)5月15日

⑱ 発 明 者 石 井 毅 東京都世田谷区南烏山1の14の30
 ⑱ 発 明 者 篠 田 友 孝 川崎市宮前区宮前平2の3の22
 ⑲ 出 願 人 財団法人 東京都精神 東京都世田谷区上北沢2の1の8
 医学総合研究所
 ⑳ 代 理 人 弁理士 阿 形 明

明 細 書

1. 発明の名称 老人斑反応性モノクローナル抗体、それを産生する細胞株及び該モノクローナル抗体の製造方法

2. 特許請求の範囲

1 タンパク変性剤としてドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動によって、単量体としての分子量160,000~180,000及び5量体としての分子量800,000~1,000,000を示すとともに、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動における等電点が6.3~8.3の範囲にあり、かつ単量体としての移動度が0.48~0.62及び5量体としての移動度が0.11~0.17の範囲にある老人斑反応性モノクローナル抗体。

2 イムノグロブリンMクラスに属する特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

3 タンパク変性剤としてドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミドゲル二次元電気泳

動によって、単量体としての分子量160,000~180,000及び5量体としての分子量800,000~1,000,000を示すとともに、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動における等電点が6.3~8.3の範囲にあり、かつ単量体としての移動度が0.48~0.62及び5量体としての移動度が0.11~0.17の範囲にある老人斑反応性モノクローナル抗体を産生する細胞株。

4 モノクローナル抗体がイムノグロブリンMクラスに属するものである特許請求の範囲第3項記載の細胞株。

5 マウス骨髓腫細胞とアミロイドタンパクを抗原としてマウスに免疫して得られた脾細胞とを細胞融合させて成る細胞株にモノクローナル抗体を産生させることを特徴とする、タンパク変性剤としてドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動によって、単量体としての分子量160,000~180,000及び5量体としての分子量800,000~1,000,000を示すとともに、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミドゲル

二次元電気泳動における等電点が6.3~8.3の範囲にあり、かつ単量体としての移動度が0.48~0.62及び5量体としての移動度が0.11~0.17の範囲にある老人斑反応性モノクローナル抗体の製造方法。
6 アミロイドタンパクが、ヒト原発性アミロイドーシス患者に沈着したアミロイドタンパクをアルカリ処理して変性したものである特許請求の範囲第5項記載の方法。

7 モノクローナル抗体がイムノグロブリンMクラスに属するものである特許請求の範囲第5項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、老人斑に特異的に反応するモノクローナル抗体、それを産生する細胞株及び該モノクローナル抗体の製造方法に関するものである。さらに詳しくいえば、本発明は、老年痴呆症の診断に有用な、脳組織における老人斑構成物質及びそのタンパク質と相同性の高い脳血管沈着物質と特異的に反応するモノクローナル抗体、それを産生

する細胞株及び該モノクローナル抗体の製造方法に関するものである。

従来の技術

近年、人口構成が高齢化するに伴い、老年痴呆症が社会問題となりつつある。この老年痴呆症の中でもアルツハイマー型老年痴呆及びアルツハイマー病(以下、この両者を合わせてSDATと略す)に関しては、病因が不明であって、治療法のみならず明確な診断方法も確立されていないのが現状である。

現在、SDATの診断方法としては、主として患者の言動から痴呆の程度を求める臨床知見によるものと、脳の剖検、生検によって得た病理知見によるものとがあり、診断確立は患者の死後に脳の剖検によることが多い。

SDATの病理知見からの診断指標の1つとして、患者の脳に正常老人よりもはるかに多く沈着する老人斑の数が採用されている。すなわち、剖検又は生検によって得たSDAT患者脳切片をコンゴアレッドを用いて染色し、光学通常顕微鏡下で赤く染ま

-3-

り、かつ偏光顕微鏡下で緑色の複屈折を示す顆粒状のもので、斑状に分布する老人斑を計数し、その数の多いことをSDATの診断の1つの根拠としている。これは、老人斑を構成するアミロイドタンパクのアミロイドとしての性質に基づくものである〔「臨床神経学」第22巻、第1106~1108ページ(1982年)、「日本老年医学会雑誌」第19巻、第354~358ページ(1982年)、「神経内科」第12巻、第235~243ページ(1980年)〕。

しかしながら、このようなコンゴアレッド染色による老人斑の確認方法は、アミロイドタンパクに共通の確認方法であり、老人斑に特異的でなく、また、偏光下での緑色複屈折の色調も微妙で、偏光下で類似の色調を示す他の物質との識別が容易でないことが多い上に、アミロイドタンパクがある程度の大きさ以上の顆粒状などの構造体にならなければ検出できず、検出感度が低いなどの欠点を有している。

また、この老人斑が過ヨウ素酸-シッフ(PAS)染色陽性であることを利用して、脳切片中の老人

-4-

斑を検索し、SDATの診断指標の1つとすることも行われているが〔「神経内科」第12巻、第235~243ページ(1980年)〕、この過ヨウ素酸-シッフ(PAS)染色法は、主として糖類の組織化学的染色に用いられるものであり、老人斑のみに特異的に反応するものではない。

さらに、該老人斑と反応する抗体としては、例えば抗ヒト免疫グロブリン抗体〔「アクタ・ニューロパソロジカ(acta neuropathol.)」第32巻、第157~162ページ(1975年)、同第36巻、第243~249ページ(1976年)など〕、抗ヒトブレアルブミン抗体〔「アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー(American Journal of Pathology)」第107巻、第41~50ページ(1982年)〕、抗ヒト補体抗体〔「アクタ・ニューロパソロジカ(acta neuropathol.)」第63巻、第296~300ページ(1984年)、同第57巻、第239~242ページ(1982年)〕などが報告されている。しかしながら、これらの抗体はいずれもポリクローナル抗体であり、しかもその目的は老人斑の検索ではなく、老人斑構成

又は随伴タンパクの性質を明らかにしようとしたものであるし、またこれらの抗体を老人斑の検索に用いたとしても、該抗体は老人斑に対して特異的なものでないため、脳内の老人斑以外に存在する免疫グロブリン、プレアルブミン、補体とも反応するという問題がある。

従来、老人斑アミロイドタンパクをそのまま抗原として動物に免疫し、抗血清を得る方法も試みられているが、アミロイドの難溶性のため、力価の高い抗体は得られていない。また、この方法により得られる抗血清やポリクローナル抗体は、特異性、生産性及び品質の安定性に問題がある。

例えば、抗血清をイオン交換クロマトグラフィーなどにより免疫グロブリン分画を回収して得られるポリクローナル抗体は、特異性の低い抗体や、免疫に使用した異物中に混在する所望のものとは異なる異物に対して反応する抗体も含んでおり、その特異性において不十分であり、実用には適さない。また、動物を免疫するために絶えず抗原となる特定のタンパク質が必要であり、かつこのタ

ンパク質の品質が変われば、当然免疫された動物から得られる抗体も品質が変わる上に、動物の個体間でも得られる抗体の力価が異なるので、安定した品質の抗体を得ることは困難である。さらに、動物を免疫してから、その抗血清を得るまでには、通常1～3か月を要し、その間免疫強化注射や動物の飼育などに多くの労力が必要となるので実用的でない。

ところで、モノクローナル抗体は、抗血清より得られる抗体が種々の抗体の混合物であるのに対して、ただ1種類の抗体(すなわち、モノクローナル抗体)のみから成るため、常に一定の抗原特異性を示す。このモノクローナル抗体は、細胞融合法(「ネイチャー(Nature)」第256巻、第495～497ページ(1975年))によって、抗体産生株を新たに形成せしめ、この抗体産生株より得られることが知られている。また、ある種のウィルス(Epstein-Barr Virus)などを用いて、抗体産生能を有する正常細胞を長期培養可能な抗体産生株に変異させて、その抗体産生株よりモノクローナル抗体を得

-7-

ることも可能である。

前者の細胞融合法について、さらに詳しく説明するならば、例えば、マウスなどの免疫可能な動物を抗原で免疫し、免疫成立後、その動物から脾臓などを外科的に取り出すことなどによって、抗体産生能を有する細胞を入手する。この抗体産生能を有する細胞(リンパ球B細胞)と、ある種のマーカーを持つ無限増殖性細胞株(以下、単に親株と称す)とを融合促進剤の存在下、あるいはある種のウィルスの存在下で融合する。ここで用いる親株のマーカーとしては、一般にある種の成分を欠いた培養液中、あるいはある種の成分を含む培養液中で生存できないことがよく利用される。例えば、DNA合成回路(サルベージ回路)においてDNA合成に関与する酵素であるヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ(Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase: HGPRT)あるいはチミジンキナーゼ(Thymidine Kinase: TK)を欠損させたものが利用される。すなわち、HGPRTやTKの酵素をもつ細胞で

-8-

は、DNA合成回路(de novo回路)におけるDNA合成阻害物質であるアミノプテリンを含む培養液(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(Hypoxanthine Aminopterin Thymidine: HAT)を含む選別用培養液(HAT培地))で培養すると、アミノプテリンによってDNA合成回路(de novo回路)が阻害されても、HGPRTあるいはTKなどの酵素によって、レスキュー回路(rescue pathway)であるサルベージ回路が働き、DNA合成が行われるのに対して、HGPRTあるいはTKのような酵素を欠損した細胞では、HGPRTあるいはTKなどの酵素によるサルベージ回路が働かないため、アミノプテリンによってDNA合成回路(de novo回路)が阻害されると、DNA合成は不可能となり、HAT培地中では生存できないことになる。

このようにして親株と正常細胞である抗体産生能を有する細胞との融合後、親株と融合細胞とを、親株が持つマーカーによって分離し、融合細胞のみを選択することができる(融合しなかった抗体産生能を有する細胞は正常細胞であるため、培養

-9-

-861-

-10-

を続けることによって死滅してしまう)。このようにして得られた融合細胞より、目的とする抗体を産生するただ1個の細胞より分裂増殖した細胞群を選択し、この細胞群よりモノクローナル抗体を産生させることができる。

一方、老人斑のアミロイドタンパク質の性質については、アミノ酸組成〔「アーキ・ニューロロジ(Arch. Neurol.)」第25巻、第198~211ページ(1971年)、「ブレイン・リサーチ(Brain Research)」第24巻、第259号、第348~352ページ(1983年)など〕、及びアミノ酸配列の一部〔「プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス USA(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」第82巻、第4245~4249ページ(1985年)〕が報告されている。またSDAT患者の脳血管に沈着するアミロイドのアミノ酸配列も報告されており〔「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical & Bio-physical Research Communication)」第120巻、第885~890ページ(1984年)〕、このもの

-11-

的とするモノクローナル抗体を産生する細胞株が得られることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、タンパク変性剤としてドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動によって、単量体としての分子量160,000~180,000及び5量体としての分子量800,000~1,000,000を示すとともに、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動における等電点が6.3~8.3の範囲にあり、かつ単量体としての移動度が0.48~0.62及び5量体としての移動度が0.11~0.17の範囲にある老人斑特異的モノクローナル抗体及びそれを産生する細胞株を提供するものである。該モノクローナル抗体は、マウス骨髓腫細胞とアミロイドタンパクを抗原としてマウスに免疫して得られる脾細胞とを細胞融合させて成る細胞株にモノクローナル抗体を産生させることによって、製造することができる。

本発明において用いる抗原タンパクは、アミロ

は、老人斑アミロイドのアミノ酸配列と高い相同性があることも知られている。

しかしながら、これらの知見を利用して、実用的な老人斑反応性モノクローナル抗体を産生する技術はまだ確立されていない。

発明が解決しようとする問題点

本発明は、このような事情のもとで、SDAT患者の脳組織における老人斑構成物質及びそのタンパク質と相同性の高い脳血管沈着物質と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する細胞株を確立し、この細胞株より産生された該老人斑反応性モノクローナル抗体を提供することを目的となされたものである。

問題点を解決するための手段

本発明者らは前記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、意外にもアミロイドタンパク、特に原発性アミロイドーシス患者の剖検脾から抽出したアミロイドタンパクのアルカリ処理物を抗原としてマウスに免疫して得られる脾細胞とマウスの骨髓腫細胞とを細胞融合することにより、目

-12-

イドタンパク、好ましくはヒト原発性アミロイドーシス患者に沈着したアミロイドタンパク(通常ALタンパクと呼ばれる)、特に好ましくは、このALタンパクをアルカリ処理して成る変性アミロイドタンパク(以下変性ALタンパクとする)である。この変性ALタンパクの好適な製造方法の1例を示すと、ヒト原発性アミロイドーシス患者の脾臓、肝臓、腎臓などの臓器や関節などにはアミロイドタンパクが沈着しているので、まず、アミロイドタンパクを含有する前記臓器をホモジナイズしたのち、このホモジネートから非アミロイドタンパクを0.1~0.2M程度の濃度の食塩水で抽出除去し、残の粗アミロイドタンパクを水抽出により溶液状態とし、次いで、この溶液に塩濃度が0.1~0.2M程度になるように塩化ナトリウムなどを加えて、粗アミロイドタンパクを沈殿させたのち、この沈殿を0.05~0.15M程度の濃度の水酸化ナトリウム水溶液により室温で10~30時間処理後、中和することによって該変性ALタンパクが得られる。

抗原タンパクとしては、SDAT患者の脳から単離

した老人斑アミロイドタンパクを用いることも可能であるが、このものは溶解度が低く、かつ抗原とするのに十分な量を得ることが容易でない上、抗原性が低いなどの問題があるので、抗原タンパクとしては、前記のALタンパク、特に変性ALタンパクが好適である。

本発明においては、前記抗原タンパクを通常の方法によりマウスに免疫したのち、その脾臓を取り出し、細胞融合の一方の細胞とする。例えば、抗原アミロイドタンパクをフロイントの完全アジュバントなどと共に、BALB/Cマウスに免疫し、免疫成立後、そのマウスより脾臓を外科的に取り出すことによって抗体産生能を有する細胞が得られる。

次に、このようにして得られたマウス脾細胞とマウス骨髓腫細胞(親株)とを好ましくは融合促進剤の存在下で細胞融合する。この親株としては種々の株が報告されており、前記マウス脾細胞に適した親株が選ばれ、該脾細胞と細胞融合される。前記BALB/Cマウス由来の脾細胞と細胞融合させる親株としては、例えばBALB/Cマウスのミエローマ

細胞由来のHGPRT欠損細胞株であるP3-X63-Ag8株などが用いられる。

細胞融合の際に用いられる融合促進剤としては、各種分子量のポリエチレングリコール(PEG)が一般によく用いられるが、人工脂質小胞であるリポソーム(liposome)やセンダウィルス(HVJ)なども用いることができる。また、これらの融合促進剤を用いずに、細胞に電圧をかけることによって細胞融合する電気融合法も知られている。

親株としてP3-X63-Ag8株を用い、細胞融合した場合、融合後に、HAT培地で培養することによって、抗体産生能を有する細胞(正常細胞)とP3-X63-Ag8とから成る融合細胞のみを選択することができる。

このようにして得られた融合細胞の中で、本発明に係る抗原と最もよく反応する抗体を産生する融合細胞(抗体産生株)は、融合細胞の培養上清を用いて、特異抗体測定のための免疫学的測定法によって選択できる。

この特異抗体の測定は、例えばポリスチレン製マイクロプレートなどを固相として、特異抗原で

-15-

ある変性ALタンパク質を吸着させ、次に融合細胞培養上清を加えて反応させる免疫測定法によって行うことができる。例を挙げて詳しく述べるならば、まずポリスチレン製マイクロプレートに該タンパク質を吸着させる。この際、タンパク質吸着用緩衝液としては、一般に炭酸ナトリウム・炭酸水素ナトリウム緩衝液が好ましく用いられている。あるいはリン酸緩衝液などを用いることも可能である。本発明者らの経験では、吸着の際の特異抗原又は対照抗原の濃度は $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で十分であるが、この濃度未満でも、抗体濃度や以下の反応条件を変えることによって、十分に測定できた。この炭酸ナトリウム・炭酸水素ナトリウム緩衝液などで至適濃度に調製された特異抗原又は対照抗原を、ポリスチレン製マイクロプレートへ一定量ずつ加え、一定時間静置する。これは、4℃で一晩放置するのが最も一般的であるが、その他、室温で2時間程度静置することも可能である。あるいは37℃で1時間静置によっても可能である。このようにして抗原を感作したポリスチレン製マ

-17-

-16-

クロプレートと、例えば界面活性剤を含むリン酸緩衝液などによって洗浄したのち、融合細胞培養液中の抗体を一定時間反応させる。上記と同様にしてポリスチレン製マイクロプレートを洗浄したのち、あらかじめ決定しておいた希釈倍率に希釈した酵素標識抗マウスIgG抗体を加えて、ポリスチレン製マイクロプレート上で抗原・抗体反応した抗体と反応させる。さらに上記と同様にしてポリスチレン製マイクロプレートを洗浄したのち、酵素基質を加えて酵素活性を測定する。ここで測定できた酵素活性は、ポリスチレン製マイクロプレートに吸着した抗原と反応した、融合細胞培養液中の抗体の量を間接的に示している。これによって、融合細胞培養液中の抗体の特異性を測定できる。また、ここでは酵素標識抗マウス抗体を用いた酵素免疫測定法について述べたが、その他、ラジオアイソトープで標識した抗マウスIgG抗体を用いて、同様の手段で行うことも可能である。

その他、一般に用いられる抗体の特異的検出法

-863-

-18-

によってもできる。

これらのスクリーニング法と、例えば限界希釈法やソフトアガーを用いる方法などによるクローニング法との組合せによって、最終的に目的とする抗体を産生する単一の細胞クローンである抗体産生株を含む一群のクローンを確立できる。

このようにして得られたクローンから、モノクローナル抗体を得、これを用いてアルツハイマー型老年痴呆(SDAT)患者脳を免疫組織化学的に検索し、老人斑と強く反応する抗体及びその産生株を選挙する。このようにして、目的とするモノクローナル抗体及びその産生株を得ることができる。

抗体産生株からモノクローナル抗体を得るには、例えばまずモノクローナル抗体産生株を、ブリストンなどであらかじめ刺激したマウスの腹腔に注入し、一定期間経過後、その動物の腹腔にたまった腹水を採取するか、あるいは抗体産生株を培養し、培養上清を採取する。このようにして採取したモノクローナル抗体を含む液から、通常行われている抗体の精製方法に従って、目的とするモノ

クローナル抗体を得ることができる。

この抗体を精製するには、例えば腹水に硫酸ナトリウムなど通常塩析に用いられる塩を加えて塩析し、得られた沈殿を遠心分離によって回収したのち、この沈殿を、リン酸緩衝液などのような中性の緩衝液で溶解し、次いで透析などによって、硫酸ナトリウムなど塩析に用いた塩を除去する。これから、イオン交換クロマトグラフィーなどの通常行われている抗体の精製方法によって、目的とするモノクローナル抗体を含む分画を回収することができる。そのほか、細胞株の培養上清を濃縮したのち、前記精製方法を行うか、又は抗マウスIg抗体、抗原に用いた変性ALタンパク、プロテインAなどを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって、目的とするモノクローナル抗体を回収することもできる。

このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体は、イムノグロブリンM(IgM)又はイムノグロブリンG(IgG)クラスであることが多く、特にIgMクラスである場合が多い。また、タンパク

-19-

変性剤としてドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動によって、単量体としての分子量160,000~180,000、及び5量体としての分子量800,000~1,000,000を示し、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミド二次元電気泳動における等電点が、タンパクの泳動位置に相当するpHをそのタンパクの等電点として6.3~8.3の範囲を示す。さらに、タンパク変性剤を用いないポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動における移動度が、アルブミンの最先端部の移動度を1.0としたとき、単量体として0.48~0.62、5量体として0.11~0.17の範囲を示す。このように、本発明のモノクローナル抗体は主としてIgMクラスであるので、単量体(分子量約170,000前後)と5量体(分子量約900,000前後)の混合物として得られることが多い。

本発明のモノクローナル抗体を用いた脳切片の免疫組織化学的検索は、通常の方法によって行われる。すなわち、死後凍結脳又はホルマリンなどで固定したパラフィン封入脳などから組織切片を

-20-

作成し、これをトリプシンで短時間処理する。この処理は、通常0.1%トリプシンを用い、37℃の温度で10分間行われる。このようなトリプシン処理は必ずしも必要ではないが、トリプシン処理した方が老人斑と本発明のモノクローナル抗体との反応が強くなり、非特異的な反応も抑制することができる。

このようにして得た切片を、本発明のモノクローナル抗体を用いて、パーオキシダーゼ-アンチパーオキシダーゼ(PAP)法やアビジン-ビオチン(ABC)法などにより免疫染色する。パーオキシダーゼによる発色の基質としてはジアミノベンジンなどが一般に用いられる。

また、本発明のモノクローナル抗体をローデミン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)などの色素で標識することにより、酵素を介さず直接老人斑を染めることもできる。さらに、放射性同位元素で本発明のモノクローナル抗体を標識し、老人斑と反応させることもできる。この場合は、老人斑の量が放射能でカウントできるので迅速か

-21-

-864-

-22-

つ容易な老人斑の定量方法ともなる。

このような本発明のモノクローナル抗体を用いる方法を、従来のコンゴレッドによる染色後、偏光下で緑色の複屈折をみる方法や電子顕微鏡によるアミロイド繊維の確認方法などと組み合わせることにより、本発明のモノクローナル抗体が老人斑のアミロイド繊維と特異的に反応することが明らかとなった(実施例参照)。

なお、本発明のモノクローナル抗体は、一部SDAT患者の脳血管に沈着するアミロイドと弱く反応することがあるが、これは老人斑アミロイドタンパクと脳血管アミロイドタンパクとの相同性により、同じ抗原を認識するものと思われる。また、本発明のモノクローナル抗体は、臓器切片上において抗原としたALタンパクから成るアミロイドとは反応しない。

本発明のモノクローナル抗体が認識する抗原物質は明確ではないが、アミロイド繊維そのもの又は付随するタンパクや糖タンパクなどであると考えられる。

-23-

断にも有用であると思われる。

また、本発明の抗体産生株は、常に一定の抗原特異性や抗原との結合力を有する抗体(すなわち、モノクローナル抗体)を産生し、かつ、動物を免疫して得られる抗体が多様な抗体の混合物であるのに対して、単一の抗体であるため、一定の力価に調整することが容易である。つまり、安定した品質の抗体を安定供給できるなど工業的にも有用である。

実施例

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1 モノクローナル抗体産生株の調製

(1) 抗原の調製

原発性アミロイドーシス患者の剖検脾10gを氷冷した0.15M塩化ナトリウム-0.05%アジ化ナトリウム溶液100 μ l中に入れ、ホモジナイザーにより約3000rpmの回転数で5分間処理して脾のホモジネートを得た。このホモジネートを4℃で、12000 $\times g$ で30分間遠心分離し、上清の280nmにお

発明の効果

本発明によると、SDAT患者の脳に多量みられる老人斑タンパク質など及びそのタンパク質と相同性の高い脳血管に沈着するタンパク質などに対して特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する細胞株が提供され、老人斑特異的なモノクローナル抗体を得ることが可能になったため、免疫学的手法を用いた脳の老人斑の高感度かつ高特異性の検索を行うことができる。

また、本発明のモノクローナル抗体は、SDAT患者の他の脳の組織、例えばミエリン(myelin)、軸索[アクソン(axon)]、神経細胞[ニューロン(neuron)]、グリア(glia)細胞とは免疫組織化学的に反応せず、したがって、該モノクローナル抗体を用いることにより、老人斑の検索が極めて容易に行える。

さらに、本発明のモノクローナル抗体を用いて、血清又は脳脊髄液中に存在すると思われる老人斑に特異的な構成タンパク質又はその前駆タンパクなどを検索することが可能となり、SDATの早期診

-24-

ける吸光度(OD₂₈₀)を測定した。沈渣を前記0.15M NaCl-0.05%NaN₃溶液100 μ lに再度懸濁し、前記の遠心分離を行うという操作を、OD₂₈₀が0.05以下となるまで5回(計6回)繰り返した。

このようにして得られた沈渣に氷冷した蒸留水80 μ lを加え、5分間約3000rpmでホモジナイズしたのち、このホモジネートを4℃、12000 $\times g$ で30分間遠心し、上清を得た。また、この際得られた沈殿については、前記の氷冷蒸留水処理をさらにを行い、遠心処理後の上清(2回目の上清)を得、2回目の氷冷蒸留水処理の沈渣を再度氷冷蒸留水処理して3回目の上清を得た。1回目、2回目、3回目の上清を混合して粗アミロイドタンパク溶液を得た。

次に、このようにして得られた粗アミロイドタンパク溶液に4℃の条件下、塩化ナトリウムを加えその濃度が0.15Mとなるようにした。この操作により、析出、沈殿してくる粗アミロイドタンパクを、4℃、12000 $\times g$ で60分間遠心分離することによって集めた。次いで得られた沈渣10.5 μ gを

-25-

-865-

-26-

0.1M水酸化ナトリウム水溶液で室温中16時間処理することにより可溶化した。この0.1MNaOH溶液を0.1M塩酸で中和して抗原溶液を得た。

(2) マウスへの免疫

(1)で得た抗原溶液(タンパク濃度500 μ g/ μ l)0.1 μ lに等量のフロイント完全アジュバント(Freund's complete adjuvant)を加えて十分に混和した。この完全な油中水型エマルジョンとしたものを雌の7週令のBALB/Cマウスに皮下注射した。さらに1か月半後に同じ抗原溶液0.1 μ lを腹腔に注入して免疫強化(boost)した。免疫強化の3日後に脾臓を取り出し、ダルベッコの最少基本培地(Minimum Essential Medium、以下DHEN培地と略す)を注射器で脾臓に注入し、脾細胞を洗い出し分散させ、さらにメッシュを通すことにより脾臓を取り除いた。

(3) 細胞融合

マウスのミエローマ細胞株P3X63-Ag8の細胞 2×10^7 個と、(2)で得た脾臓細胞 8.6×10^7 個とをDHEN培地(無血清)中で十分に混合したのち、

遠心分離して上清を捨てた。この沈渣にDHEN培地2.0 μ l当り、ポリエチレングリコール4000(PEG4000)2.0gを溶解した液1.0 μ lを室温で1分間要して加えたのち、37℃の湯浴中で90秒間インキュベートして融合を行わせた。次いでDHEN培地9 μ lを室温で徐々に加え、さらに5分経過後DHEN培地10 μ lを添加した。

これらの細胞を十分に洗浄したのち、ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} M、ウシ胎児血清10%を含むMEN培地(以下HAT培地という)を用い、96穴培養プレート中で培養した。HAT培地は3日おきに交換し、細胞融合2週間後に、アミノプテリンを含まない以外は、前記HAT培地と同じ培地(これをHT培地と略す)に切り換え、コロニー状に生育してくる融合細胞を選択した。

(4) 酵素免疫測定法による融合細胞の選別(3)で得た融合細胞の産生する抗体の力価の測定を培養開始2週間後に以下のようにして行い、免疫に用いた抗原タンパクと反応する抗体を産生する雑

-27-

種細胞株を選別した。

i) マイクロプレートの抗原感作

免疫に用いたヒト原発性アミロイドーシス患者脾アミロイドタンパクの水酸化ナトリウム処理物(特異抗原)を0.02M炭酸ナトリウム・炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)でタンパク濃度10 μ g/ μ lとなるように調製した。この液をポリスチレン製マイクロプレートの各ウェルに100 μ lずつ加えて、蒸発を防いで4℃で一晩静置し、タンパク質を吸着させた。

ii) 一次反応

こうして物理吸着によって特異抗原を固定したポリスチレン製マイクロプレート(以下、単にマイクロプレートと称す)を、リン酸緩衝生理食塩液(塩化ナトリウム8.0g/l、リン酸一カリウム0.2g/l、リン酸二ナトリウム・7水塩2.17g/l、塩化カリウム0.2g/l、ツイーン20(Tween 20)0.5 μ l/l、アジ化ナトリウム0.2g/lを含む液、pH7.4、以下、PBSTと称す)で洗浄した。

-29-

-28-

次に、培養上清の非特異的吸着を防ぐ目的で、このマイクロプレートに10%正常ウマ血清(200 μ l/ウェル)を加え室温で1時間ブロッキングを行った。

次いで、ウマ血清を除いたのち、融合細胞の培養上清(100 μ l/ウェル)を加えて反応させた(室温(22~25℃であった)、2時間)。この際、培養上清中に、マイクロプレートに固定した特異抗原との反応性を有する抗体が存在すれば、その抗体は、抗原・抗体反応によってマイクロプレート上に保持される。

iii) 二次反応

反応後、PBSTによってマイクロプレートを洗浄した。次に、あらかじめ決定した至適希釈倍数にPBSTによって希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗マウス(IgG+IgM)抗体液を、マイクロプレートの各ウェルに100 μ lずつ添加して、室温(22~25℃)で2時間反応させた。このアルカリフォスファターゼ結合抗マウス(IgG+IgM)抗体は、マイクロプレート上に

-866-

-30-

保持された培養上清中のマウスIgG及びIgMと反応する。

iv) 酵素活性の測定

二次反応後、PBSTでマイクロプレートを洗浄したのち、マイクロプレート上に保持されたアルカリフォスファターゼ活性を測定した。酵素基質であるパラニトロフェニルリン酸を、ジェタノールアミン緩衝液(ジェタノールアミン97 μ l/l、塩化マグネシウム・6水塩100 μ g/l、アジ化ナトリウム0.2 μ g/lを含む液を塩酸を用いてpH9.8に調整した液)にて1 μ g/ μ lとなるように溶解した液を酵素基質溶液とした。この酵素基質溶液をマイクロプレートの各ウェルに100 μ lずつ添加して、室温(22~25℃)で1時間反応させた。反応後、1N水酸化ナトリウム液を50 μ lずつ各ウェルに加えて酵素反応を止めた。各ウェルの酵素基質溶液の波長405 nmにおける吸光度を測定して、酵素活性を測定した。この酵素活性は、マイクロプレート上の特異抗原あるいは対照抗原と反応した、培養上

清中の抗体量を間接的に示している。

以上の測定法と、限界希釈法によるクローニングとを3回繰り返して、特異抗原と反応する抗体を産生する、単一の細胞由来の細胞集団(すなわち、モノクローナル新規株細胞)を60クローン得た。

実施例2 老人斑に対する反応性と特異性の確認

実施例1(4)で得た60クローンの産生するモノクローナル抗体を用いて老人斑に対する反応性を検討した。

すなわち、アルツハイマー型老年痴呆患者の死後剖検脳3例の大脳皮質から厚さ2 mmの切片を切りとり、ティッシューテックO.C.T.コンパウンド(Tissue-Tek O.C.T. Compound、ラバーテックプロダクト社製)中に包埋し、液体窒素でただちに凍結した。これより、厚さ10 μ mのクリオスラット切片を作成し、スライドガラス上にマウント(mount)し、風乾後10分間アセトンで固定した。

このスライドガラス上の切片を0.1%トリプシン溶液で37℃、10分間処理したのち、トリス

-31-

緩衝食塩水(Tris buffer saline、以下TBSと略す)で3回洗浄した。これをTBSで6倍に希釈した馬血清で20分間処理し、非特異的吸着を防止した。

このように処理された脳切片を、実施例2で得たモノクローナル抗体を含む培養上清又は対照実験として非免疫マウス血清をTBS中に種々の濃度(非免疫マウス血清は100倍)に希釈した溶液中に室温下、1時間浸せきしたのち、TBSに10分間浸せきし、洗浄する操作を2回繰り返した。続いて切片を、ウサギ抗マウス(IgG+IgM)-ホースラディッシュペーパーオキシゲナーゼ複合体溶液(400倍希釈)中に30分間浸せきしたのち、TBS洗浄を前記のように3回行った。次いで、0.05%ジアミノベンジジン(DAB)及び0.01%の過酸化水素を含むトリス緩衝液(pH7.6)中に室温下、5分間浸せきしたのち、蒸留水で洗浄した。

次に、このようにして処理された切片を、光学顕微鏡での観察のためにヘマトキシリンで短時間染め、脱水したのちオリキットで封入した。

また、電子顕微鏡を用いた観察のために、前記

-32-

のDABとの反応後、2%のグルタルアルデヒド溶液で切片を固定し、さらに1%四酸化オスミウムで後固定して脱水したのち、エポン(EPON)に包埋した。樹脂が固まってからウルトラミクローム(LKB社製)を用いて超薄切片を作成し、80KVの条件で、日本電子社製JEN200CXを用いて観察した。

光学顕微鏡下での観察により、実施例1(4)で得た60クローンの培養上清の老人斑特異性を評価した結果、最も強く反応するクローンS-1を選出したこのクローンS-1が産生するモノクローナル抗体をSA-1と名づける。

モノクローナル抗体SA-1は、定型老人斑(核がはっきりしている老人斑)及び原始老人斑(核がはっきりしない)のいずれにも強く反応し、ジアミノベンジジン顆粒によって深かつ色に強く染まった。しかし、脳切片中のミエリン(myelin)、軸索(アクソン(axon))、神経細胞(ニューロン(neuron))、グリア(glia)細胞とは全く反応しなかった。また、脳血管とは一部反応したが、これはSDATに随伴して起る脳血管へのアミロイド物質の沈着アミロイ

-33-

-867-

-34-

ドアンジオパチー(Amyloid Angiopathy)によるものと思われる。すなわちこのアミロイドアンジオパチーのアミロイドタンパクが老人斑アミロイドタンパクと極めて高い相同性を有するため、モノクローナル抗体SA-1が老人斑と共に一部の脳血管アミロイドと反応したものと思われる。

一方、電子顕微鏡下での観察によると、老人斑のアミロイド繊維は、暗色のパーオキシダーゼ-DAB反応生成物で覆われているのに対し、他の組織、すなわちグリア細胞やアルツハイマー原線維変化をもつ神経細胞及び軸索、アルツハイマー原線維変化を含まない神経細胞及び軸受、ミエリン、血管はすべて染まらなかった。

また、抗原タンパクを抽出した原発性アミロイドーシスの脾切片を、前記の脳切片の場合と同様にしてモノクローナル抗体SA-1と処理したが全く反応しなかった。

実施例3 モノクローナル抗体の精製

(1) 培養による方法

クローンS-1をウシ胎児血清10%含有DMEM培

地を用いて、細胞濃度 $0.5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 個/ μ lで培養し、24時間ごとにその培養上清を回収した。この回収した培養上清は、0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)に対して4℃で一晩透析してpHを8.0に調整した。

この液をウサギ抗マウスIgM抗体(マイルス社製、 μ 鎖特異的)を結合したセファロース-4B(ファルマシア社製)を充てんしたカラムに流し、培養上清中のモノクローナル抗体SA-1を該セファロース-4Bに結合させた。次いで、カラムに、0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)を流して十分に洗浄後、グリシン-塩酸緩衝液(0.1Mグリシン、0.2M塩化ナトリウムを含有する液に塩酸を加えてpH3.0に調整した液)を流し、溶出されるタンパク分画を回収した。回収したタンパク分画は、ただちに0.5Mリン酸緩衝液(pH7.2)を加えて中性にし、これを精製モノクローナル抗体(以下SA-1Pと略す)溶液とした。

(2) マウス腹腔による方法

あらかじめ腹腔にブリスタン(アルドリッチ社

-35-

製)0.5 μ lを注入して刺激しておいたマウス(6週令、BALB/C、雌)の腹腔に、 5×10^4 個の新規雑種細胞クローンS-1を注入した。およそ1週間後より腹水が貯留しだした。適宜注射器によって腹腔にたまった腹水を採取した。

このようにして得た腹水は、次のようにして精製を行った。腹水をまず3000rpmで20分間遠沈して沈殿を除去した。次に、得られた上清に10 μ l当り硫酸ナトリウム1.8gを加えて2時間室温で振とうし、1時間室温で静置して塩析した。塩析により生じた沈殿を8000 \times gで20分間遠沈して回収した。回収した沈殿を0.02Mリン酸緩衝液(pH6.8、0.05M塩化ナトリウムと0.02%アジ化ナトリウムを含む)で溶解し、一晩透析した。この液を次に、上記リン酸緩衝液にて平衡化したDEAE-セファデックスカラム(DEAE-Sephadex A-50、ファルマシア社製)に流して分画した。各分画の抗特異抗原(実施例1で用いた抗原)モノクローナル抗体活性を実施例1で述べた酵素免疫測定法によって測定し、抗特異抗原モノクローナル抗体活

-37-

-36-

性を有する分画を回収した。

この分画はIgM溶出位置に一致した。これを精製モノクローナル抗体溶液とした。

実施例4 本発明のモノクローナル抗体(SA-1)の生化学的性質

(1) タンパク変性剤を加えた実施例1で、二次元電気泳動によって得た精製モノクローナル抗体SA-1Pを、まず、タンパク変性剤不存在下で等電点電気泳動し、次いでタンパク変性剤存在下に二次元電気泳動を行った。

すなわち、抗IgM抗体を結合したアフィニティカラムで精製したモノクローナル抗体SA-1P溶液(タンパク量1 μ g/ μ l)5 μ lを、ポリアクリルアミド・チューブゲル(ゲルサイズ径3 μ m \times 6.5 μ m)に加え、0.01Mリン酸と0.14N水酸化ナトリウムとを用いて、pH3.5~10の間で等電点電気泳動した(定電圧200V、120分)。

次に、このチューブゲルを1重量%のSDSを含む4~17重量%のポリアクリルアミド濃度勾配をもつスラブゲル(ゲルサイズ横75 \times 縦60 \times

-868-

-38-

厚さ2.7mm)上に密着させたのち、0.1%のSDSを含むトリス・グリシン緩衝液I(トリスヒドロキシメチルアミノメタン0.05M、グリシン0.384M、pH8.3)を用いて、定電流(ゲル当り30mA)で、約180分間泳動した。なお、泳動時間はブロムフェノールブルー(BPB)と結合したアルブミンの泳動状態より判断した。

このゲルを、クローマシー・プリリアント・ブル-0.025重量%、メタノール50重量%、酢酸7重量%を含む水溶液(以下染色液と略す)に浸して、8時間室温でゆっくり振り混ぜたのち、10%メタノール及び7%酢酸を含む脱色液を加えて1日間振り混ぜて脱色した。

分子量マーカーを泳動した結果と、アルブミンの泳動位置とから、このモノクローナル抗体SA-1Pの分子量を決定した。

その結果、SA-1Pは、分子量170,000(160,000~180,000)と分子量900,000(800,000~1,000,000)の2つのバンドに分かれた。170,000のものは単量体であり、900,000のものは5量体であると考

えられる。また、等電点は単量体、5量体とも6.3~8.3であった。

(2) タンパク変性剤を加えない二次元電気泳動(1)で用いた精製モノクローナル抗体SA-1P溶液について、電気泳動緩衝液及びポリアクリルアミドゲルにSDSを加えないこと以外は、

(1)と同様にして二次元電気泳動を行った。

その結果アルブミンの最先端部の移動度を1.0として、SA-1Pの移動度は0.16~0.57であった。

(3) モノクローナル抗体のクラスの決定

(1)と同じようにして、二次元電気泳動を行ったのち、以下のようにして転写を行った。

すなわち、転写用容器(イムノディカ社製、商品名 水平型電気泳動式トランスファー・プロッティング装置)にトリス・グリシン緩衝液2(トリスヒドロキシメチルアミノメタン0.025M、グリシン0.192M、pH8.3)を"おさえパット"が浸るまで入れたのち、おさえパットの上にも紙をのせた。この紙の上に、二次元電気泳動したポリアクリルアミドスラブゲルをのせ、さらに、その上にニ

-39-

トロセルロース膜(シュライハーアンドシュエル社製、75×55mmサイズに切って使用)を重ねた。これらに一定電圧(20V)で18分間通電して、二次元電気泳動法で泳動・分画したモノクローナル抗体SA-1を、二次元電気泳動ゲルからニトロセルロース膜へ転写した。

このニトロセルロース膜(以下、転写ニトロセルロース膜という)を2%ウシ血清アルブミンを含むトリス・塩酸緩衝液(10mMトリスヒドロキシメチルアミノメタン・塩酸緩衝液、pH7.2、0.8%NaCl、0.01%NaN₃)中に浸し、一晚4℃で静置した。次に、転写ニトロセルロース膜を、ヤギ抗マウスIgM抗血清(μ鎖特異的、マイルズ社製)をトリス・塩酸緩衝液で5倍希釈した液に浸して、室温(20~25℃)で1時間振り混ぜ(20回/分)反応させた。反応後、転写ニトロセルロース膜をトリス・塩酸緩衝液に浸して室温で振とう(20回/分)することによって洗浄した。この際トリス・塩酸緩衝液は、5分おきに5回交換した。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIg

-40-

抗体(L+H鎖特異的、マイルズ社製を、1%ウシ血清アルブミンを含むトリス・塩酸緩衝液によって、あらかじめ決定しておいた希釈濃度に希釈(通常500倍)した液(2次抗体液)に、転写ニトロセルロース膜を浸して室温で2時間静置し、反応させた。次に、上記と同様にして転写ニトロセルロース膜を洗浄したのち、酵素基質溶液を加えて室温で10分間静置し、転写ニトロセルロース膜上のペルオキシダーゼ活性を測定した。ここで酵素基質溶液には、0.2mM 3,3'-ジアミノベンジジン、30%過酸化水素水を0.1%含むトリス・塩酸緩衝液を用いた。

この結果、二次元電気泳動で得た2つのバンドが抗マウスIgM抗体と反応していることが分った。

同様にして、市販の抗マウスIgG、抗マウスK鎖、抗マウス入鎖(いずれもマイルズ社製、ウサギ血清、製造元能書に記された希釈倍率で使用)などの抗血清を用い、イムノプロッティングを行ったが、モノクローナル抗体SA-1Pは、抗マウスK鎖とのみ反応した。これらのことからモノクロー

-41-

-869-

-42-

ナル抗体SA-1PのクラスはIgM、タイプはK型であることが分った。

4. 図面の簡単な説明

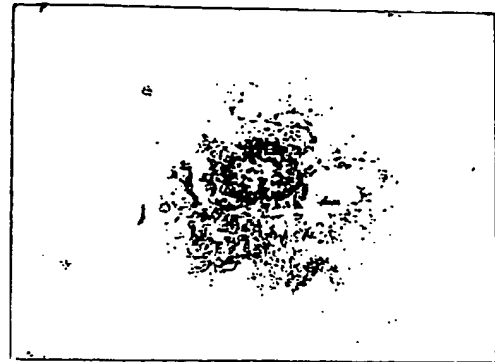
第1図及び第2図は、本発明のモノクローナル抗体SA-1を用いてSDAT患者の脳切片を検索した際の光学顕微鏡による観察図であり、第1図は定型老人斑、第2図の網目状老人斑の場合である。

第3図は老人斑と該モノクローナル抗体SA-1との反応の電子顕微鏡による観察図である。

第4と第5図は精製モノクローナル抗体SA-1Pの二次元電気泳動結果であり、第4図はSDS存在下でのクマーシー染色したもの、第5図はSDS存在下で泳動後、抗マウスIgH抗体を用いてイムノブロッティングしたものである。

図面の浄書(内容に変更なし)

第 1 図



第 2 図



第 3 図



手続補正書(方式)

昭和61年8月15日

特許庁長官 黒田 明 雄 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第109433号

2. 発明の名称

老人斑反応性モノクローナル抗体、それを産生する細胞株及び該モノクローナル抗体の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都世田谷区上北沢2の1の8

財団法人東京都精神医学総合研究所

理事長 賀 洞 哲 夫

4. 代理人

東京都港区新橋2丁目2番2号川志満・邦信ビル8階

(7182) 弁理士 阿 形 明

電話(591)9910番

5. 補正命令の日付 昭和61年7月2日

(発送日:昭和61年7月29日)

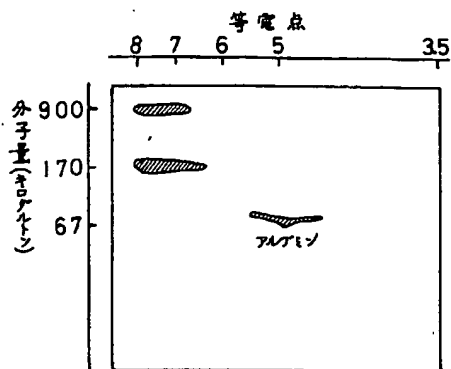
6. 補正の対象 図 面

7. 補正の内容 添付図面中第1図及び第2図を

別紙のとおり訂正します。



第4図



第5図

